

· 化学与分析 ·

不同产地白头翁中白头翁皂苷 D 的含量测定

尹姗¹, 饶小勇^{2,3}, 何雁¹, 杨世林^{1,3}, 罗晓健^{1,3*}

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 北京中医药大学, 北京 100029;
3. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 南昌 330006)

[摘要] 目的:建立白头翁中白头翁皂苷 D 的含量测定方法。方法:采用 HPLC 测定白头翁皂苷 D 的含量,色谱条件为依利特 Hypersil ODS₂ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),流动相乙腈-水-甲酸(38:62:0.1),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm,柱温 25 ℃,考察不同产地白头翁中白头翁皂苷 D 的含量差异。结果:白头翁皂苷 D 线性范围 0.311 2~3.112 μg (r=0.999 9),精密度 RSD 1.36%,重复性 RSD 1.65%,供试品溶液在 24 h 内稳定,平均加样回收率 98.07% (RSD 0.64%)。吉林产白头翁中白头翁皂苷 D 含量最高(0.256%),比广东产白头翁高了约 20 倍。结论:该测定方法简便易行、结果准确、重复性好。不同产地的白头翁中白头翁皂苷 D 的含量差异较大,选用时应慎重。

[关键词] 白头翁; 白头翁皂苷 D; 含量测定; 三萜皂苷; 抗肿瘤作用
[中图分类号] R283.6;R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0036-03
[doi] 10.11653/syfy2013200036

Determination of Pulsatilla Saponin D in
Pulsatillae Radix from Different Areas

YIN Shan¹, RAO Xiao-yong^{2,3}, HE Yan¹, YANG Shi-lin^{1,3}, LUO Xiao-jian^{1,3*}

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 3. National Pharmaceutical
Engineering Center for Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] Objective: To establish a determination method for pulsatilla saponin D in Pulsatillae Radix. Method: The content of pulsatilla saponin D was determined by RP-HPLC, chromatographic conditions were as follows: Elite Hypersil ODS₂ C₁₈ column (4.6 mm×250 mm, 5 μm), mobile phase of acetonitrile-water-formic acid (38:62:0.1), flow rate 1.0 mL·min⁻¹, detection wavelength 203 nm, column temperature 25 ℃. Content difference of pulsatilla saponin D in Pulsatillae Radix from different areas was investigated. Result: Pulsatilla saponin D had good linear relationship in 0.311 2-3.112 μg (r = 0.999 9), RSD of instrument precision was 1.36%, RSD of method repeatability was 1.65%, samples solution was stable within 24 h, the average recovery was 98.07% (RSD 0.64%). The content of pulsatilla saponin D in Pulsatillae Radix from Jilin was the highest (0.256%), which was 20 folds higher than Pulsatillae Radix from Guangdong. Conclusion: This method was simple, accurate and repeatable. The content of pulsatilla saponin D in Pulsatillae Radix from different areas had much difference, so materials choice should be careful.

[Key words] Pulsatillae Radix; pulsatilla saponin D; content determination; triterpenoid saponins; anti-tumor effect

[收稿日期] 20130318(017)
[基金项目] 国家科技重大专项重大新药创制项目(2011ZX11102-001-19);江西自然科学基金项目(20114BAB215045);江西省教育厅产学研合作项目(GJJ11006)
[第一作者] 尹姗,在读硕士,从事中药新制剂与新剂型研究,Tel:0791-87119610,E-mail:yinshan198909@163.com
[通讯作者] * 罗晓健,硕士生导师,教授,从事中药新制剂与新剂型研究,Tel:0791-87119619,E-mail:luoxj98@126.com

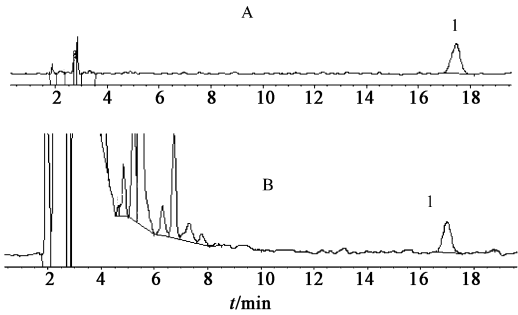
白头翁始载于《神农本草经》^[1-2],主要成分包括三萜皂苷、三萜酸、木脂素及糖蛋白等^[3],具有抗肿瘤、抗炎、抗病原微生物、抗寄生虫等作用^[4]。目前抗肿瘤作用是白头翁药理活性研究的热点^[5-11],其主要活性物质为三萜皂苷^[12-13]。近年已从白头翁中分离鉴定了十几种三萜皂苷成份^[2],其中 3-*O*- α -*L*-吡喃鼠李糖-(1 $\rightarrow$ 2)[β -*D*-吡喃葡萄糖-(1 $\rightarrow$ 4)]- α -*L*-吡喃阿拉伯糖常春藤皂苷(白头翁皂苷 D)是三萜皂苷中一种主要成分,具有很强的抗肿瘤作用^[14-16],尚未见其含量测定方法的报道。本实验采用 HPLC 测定白头翁中白头翁皂苷 D 的含量,比较不同产地白头翁中白头翁皂苷 D 的含量差异,为白头翁皂苷 D 的开发奠定基础。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),KQ-400B 型超声清洗机(巩义市予华仪器有限公司),BS2202S 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Millipore Synergy 型超纯水系统(美国密理博公司)。白头翁皂苷 D 对照品(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心对照品室提供,经 MS、NMR 鉴定和 HPLC 测定,纯度>99%),乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。白头翁(产地分别为甘肃、吉林、安徽、江西、湖南、内蒙古、福建、山东、浙江、广东)均购自樟树药材市场,经江西中医学院褚小兰教授鉴定,均为毛茛科植物白头翁 *Pulsatilla chinensis* (Bunge) Regel 的根茎。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 依利特 Hypersil ODS₂ C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm,5 μ m),流动相乙腈-水-甲酸(38:62:0.1),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 203 nm^[15],柱温 25 $^{\circ}$ C,进样量 10 μ L,见图 1。



A. 对照品;B. 供试品;1. 白头翁皂苷 D

图 1 白头翁 HPLC

2.2 对照品溶液的制备 精密称取白头翁皂苷 D 对照品适量,加流动相配制成 0.155 6 g·L⁻¹ 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液的制备 取白头翁药材中粉 10 g,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇适量,超声 45 min,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,用 0.45 μ m 微孔滤膜滤过,即得。

2.4 标准曲线的绘制 精密吸取对照品溶液 2,4,6,10,14,18,20 μ L,按 2.1 项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,得回归方程 $Y = 368.59X + 21.977$ ($r = 0.9999$),表明白头翁皂苷 D 在 0.311 2~3.112 μ g 呈良好线性关系。

2.5 精密度试验 精密吸取白头翁皂苷 D 对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次,结果峰面积的 RSD 1.36%,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性试验 精密称取内蒙古的白头翁样品 10 g,共 6 份,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,测定,结果白头翁皂苷 D 平均质量分数 0.097 6%,RSD 1.65%,表明该方法重复性良好。

2.7 稳定性试验 取同一供试品溶液,分别于 0,3,6,9,12,18,24 h 进样 10 μ L,按 2.1 项下色谱条件进行检测,记录峰面积,结果峰面积的 RSD 1.18%,表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

2.8 加样回收率试验 精密称取内蒙古的白头翁药材中粉 9 份,分成 3 批,每批 3 份,每份 10 g,分别置 100 mL 量瓶中,每批分别按白头翁皂苷 D 质量(9.762 mg)的 80%,100%,120% 加入白头翁皂苷 D 对照品溶液,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件测定,计算回收率,结果见表 1。

表 1 白头翁皂苷 D 含量测定的加样回收率试验

No.	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	7.8	17.462	98.71	98.07	0.64
2	7.8	17.375	97.60		
3	7.8	17.342	97.18		
4	9.8	19.429	98.64		
5	9.8	19.355	97.89		
6	9.8	19.339	97.72		
7	11.7	21.344	98.99		
8	11.7	21.276	98.41		
9	11.7	21.173	97.53		

2.9 样品测定 取 10 个产地(吉林、山东、内蒙古、湖南、江西、福建、广东、甘肃、安徽、浙江)的白头翁药材适量,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,测定白

头翁皂苷 D 质量分数(按干药材计算)分别为 0.256% , 0.119% , 0.086% , 0.068% , 0.037% , 0.032% ,0.012% ,0,0,0($n=3$),经 SPSS 13.0 统计分析,表明 10 个产地的白头翁药材中白头翁皂苷 D 含量存在显著性差异($P<0.05$),其中吉林产地中白头翁皂苷 D 含量比广东产地高了约 20 倍,提示市场上白头翁药材质量差距较大,科研生产时应慎重选择。

3 讨论

2010 年版《中国药典》将白头翁皂苷 B₄ 作为白头翁含量测定的指标^[17],也有大量文献以白头翁皂苷 B₄ 作为白头翁质量评价的标准^[18-19]。但一种成分并不能全面评价药品的内在质量,且单一指标成分的控制很难满足中药多组分、多靶点的作用特点,采用多指标成分控制更能全面地表征中成药质量,因此,为了更加全面地评价白头翁药材的质量,有必要增加白头翁皂苷 D 的含量测定。

预试验考察了甲醇-水-甲酸、乙腈-水-甲酸不同配比的流动相分离效果,最终选用了乙腈-水-甲酸(38:62:0.1)系统,该系统具有保留时间适中、分离度佳、峰形好等优点。建立的含量测定方法灵敏度高、重复性好、稳定可行,为进一步完善白头翁的质量标准提供参考。

通过考察不同供试品溶液制备方法(回流法、超声法、索氏法)对白头翁皂苷 D 含量的影响,结果发现超声法提取的白头翁皂苷 D 含量最高。同时对提取溶媒(水、甲醇、70% 乙醇、乙醇)和提取时间(30,45,60 min)进行了考察,结果表明经甲醇超声 45 min 后白头翁皂苷 D 的含量最高。

【参考文献】

[1] 时维静,路振香,李立顺.白头翁不同提取物及复方体外抑菌作用的实验研究[J].中国中医药科技,2006,13(3):166.
[2] 莫少红.白头翁的化学成分及药理作用研究进展[J].中药材,2001,24(5):385.
[3] 钟长斌,李祥.白头翁的化学成分及药理作用研究述要[J].中医药学刊,2003,21(8):1338.
[4] 俞浩.白头翁药理作用研究进展[J].中国兽药杂志,2006,40(7):51.

[5] 蔡鹰,陆瑜,梁秉文,等.白头翁体内抗肿瘤作用的实验研究[J].中草药,1999,30(12):929.
[6] 蔡鹰,唐永明,梁秉文.白头翁体外抗肿瘤实验研究[J].中草药,1999,30(6):441.
[7] 冯秀芝,刘伟,刘建平,等.白头翁诱导胃癌细胞凋亡的研究[J].中国现代医生,2011,49(9):1.
[8] 王海侠,郑新勇,郜尽.白头翁皂苷 B₄ 体外抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖并诱导其凋亡[J].上海交通大学学报:医学版,2011,31(10):1481.
[9] 姜成,申晓慧,李春丰,等.白头翁皂苷体外抗肿瘤试验研究[J].黑龙江农业科学,2012(10):125.
[10] 冯丹,钟长斌.白头翁中活性成分对荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用[J].中国医院药学杂志,2003,23(9):532.
[11] 黄芳,李娟,韩林涛.西南白头翁不同提取物的抗肿瘤作用研究[J].湖北中医学院学报,2008,10(3):12.
[12] 朱京童,白玉,司文秀,等.中药白头翁提取物抗肿瘤活性的体外实验研究[J].癌变·畸变·突变,2007,19(1):67.
[13] 钟邱,倪琼珠.白头翁中皂苷成分对肿瘤细胞的抑制作用[J].中药材,2004,27(8):604.
[14] Son M K, Jung K H, Hong S W, et al. SB365, *Pulsatilla* saponin D suppresses the proliferation of human colon cancer cells and induces apoptosis by modulating the AKT/mTOR signaling pathway[J]. Food Chem, 2013, 136(1):26.
[15] Hong S W, Jung K H, Lee H S, et al. SB365 inhibits angiogenesis and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma through modulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Cancer Sci, 2012, 103(11):1927.
[16] Kim Y, Bang S C, Lee J H, et al. *Pulsatilla* saponin D: the antitumor principle from *Pulsatilla koreana* [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27(9):915.
[17] 国家药典委员会.中华人民共和国药典.一部[S].北京:中国医药科技出版社,2010:96.
[18] 曲龙妹,赵春杰,李丹,等.RP-HPLC 法测定白头翁汤中白头翁皂苷 B₄ 的含量[J].沈阳药科大学学报,2009,26(1):45.
[19] 王海侠,时维静,张雪梅,等.HPLC 法测定白头翁中皂苷 B₄ 含量及其中药材标准化研究[J].中兽医医药杂志,2009,28(3):7.

[责任编辑 仝燕]